Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der
Freien Universität Berlin, Berlin-Dahlem
Direktor: Professor Dr. med., Dr. rer. nat. Ernst Schütte

Über die fermentative Reoxydation von Menadion durch Kulturhefezellen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ursula Schmitz
aus Berlin

1965

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der
Freien Universität Berlin, Berlin-Dahlem

Direktor: Professor Dr. med., Dr. rer. nat. Ernst S c h ü t t e

---

Über die fermentative Reoxydation von Menadion durch Kulturhefezellen

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ursula Schmitz
aus Berlin

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Dekan: Professor Dr. med. Adalbert Loeschke

Referent: Professor Dr. med. et rer.nat. Ernst S c h ü t t e

Korreferent: Professor Dr. med. Hans Herken

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 4. Juni 1965

Inhaltsangabe: Seite

A. Theoretischer Teil

I. Einleitung und Fragestellung 1

II. Ergebnisse

1) Die Permeation des Menadion 6

a) Vergleich der Konzentrationen von Menadion im Zellinnern und im Überstand einer Hefezellsuspension 6

b) Chinon-Spektrum in Zellsuspensionen verschiedener Dichte. 8

c) Quantitative Bestimmung des Hydrochinons 10

2) Wirkung des Menadion auf die Atmung von Hefezellen. 11

a) Sauerstoffverbrauch und respiratorischer Quotient. 11

b) Abhängigkeit von der Konzentration des Menadion 14

c) Wirkung von Menadiol. 14

3) Beeinflussung der Menadion-Atmung 15

a) Wirkung von Antimycin A. 15

b) Wirkung von Kaliumcyanid. 17

c) Wirkung von Brenzcatechin. 20

d) Wirkung von Kohlenmonoxyd. 21

III. Zusammenfassung der Ergebnisse 23

IV. Diskussion 24

1) Die Hemmung der Chinon-Atmung durch Kaliumcyanid und Kohlenmonoxyd. 24

2) Antimycin A und die durch Menadion induzierte Atmung. 25

3) Der durch Menadion induzierte Sauerstoffverbrauch. 26

4) Die Bedeutung des Chinon reoxydierenden Fermentes im Stoffwechsel der Zelle. 27

V. Zusammenfassung des theoretischen Teils. 30

Seite

B. Experimenteller Teil

I. Material 31
1) Hefe 31
2) Menadion 31
3) Methylglykol 31
4) Antimycin A 31
5) Brenzcatechin 32
6) Kohlenmonoxyd 32

II. Methoden 33
1) Manometrie 33
2) Zelltrockengewicht 34
3) Photometrie 35
4) Auffrieren der Hefezellen 35

III. Protokolle 36
1) Chinon-Spektrum im Zellinnern und Zellüberstand 36
2) Chinon-Spektrum in Zellsuspensionen verschiedener Dichte 37
3) Quantitative Bestimmung des Hydrochinons 38
4) Erhöhung der endogenen Atmung nach Zusatz von Menadion 40
5) Endogene Atmung von Hefezellen mit und ohne CO_2 im Medium 41
6) Wirkung von Antimycin A auf die endogene und die Menadion-Atmung 42
7) Hemmung der Atmung von Hefezellen in Glukose durch Antimycin A 43
8) Wirkung von Kaliumferricyanid auf die endogene und die Menadion-Atmung 44
9) Reduktion von Kaliumferricyanid bei Hemmung der Atmung mit Kaliumcyanid 45
10) Hemmung der Hexokinase durch Menadion in vitro 46

C. Literaturverzeichnis 48

Den Anstoß zu den Versuchen dieser Arbeit gab die Beobachtung von L.KIESOW, daß Menadion (2-Methyl-1,4-naphthochinon) die endogene Atmung von Hefezellen auf lange Zeit beträchtlich steigert. Es fragte sich, wie groß der zusätzliche Sauerstoffverbrauch ist und wie Menadion auf die Atmung der Zellen in Phosphat-Glukose und Phosphat-Alkohol wirkt.
Für die Erhöhung der endogenen Atmung wird nur wenig Menadion benötigt, das Chinon geht also eine Katalyse ein. Dabei wird es von den Hefezellen enzymatisch reduziert (8). Es sollte nun herausgefunden werden, ob die Reoxydation des entstandenen Hydrochinons auch fermentativ geschieht oder durch Autoxydation. Ein Ferment, das die Reoxydation des 2-Methyl - 1,4 - Naphthohydrochinons katalysiert, entdeckten COLPA - BOONSTRA und SLATER 1957 in Sarcosomen (Mitochondrien) von Pferdeherzmuskelzellen (1). Einige Menadion reduzierende Fermente wurden schon etwas früher gefunden. 1954 wies MARTIUS in den Mitochondrien von Schweineleberzellen eine Phyllochinonreduktase nach, die infolge ihrer geringen Spezifität auch Menadion hydriert (10). Unabhängig von ihm zeigten WOSILAIT und NASON im gleichen Jahr, daß in Colibazillen neben einer Chinonreduktase, die Benzochinon als Substrat hat, eine Menadionreduktase vorkommt. Die beiden Fermente unterscheiden sich durch ihre Aktivität, ihr pH-Optimum und ihre Hemmbarkeit durch verschiedene Substanzen (18).

Von KIESOW wurde 1959 bei Versuchen über die Wirkung des Menadion auf die Gärung von Hefezellen das Menadion reduzierende Ferment dieser Zellen gefunden. (8)

Sollte es sich nun nachweisen lassen, daß die Hefezellen außer dem reduzierenden auch ein Menadion reoxydierendes Ferment besitzen, so ergab sich daraus als nächstes die Frage nach der Beschaffenheit dieses Fermentes. Um darüber etwas zu erfahren, wurde nach Stoffen gesucht, die die durch Menadion induzierte Atmung verhindern und

dann verglichen, welche bekannten Fermente ebenso gehemmt werden. Läßt sich beispielsweise die Chinon-Atmung durch Kaliumcyanid hemmen, so muß es sich um eine Schwermetallkatalyse handeln (16). Als Schwermetallkomponente eines oxydierenden Fermentes kann z.B. Eisen oder Kupfer dienen. Wir kennen als Kupferferment pflanzlicher Zellen die 1937 aus Kartoffeln isolierte Phenoloxydase (9). Das von ihr am schnellsten oxydierte Substrat ist Brenzkatechin, und diese Substanz ermöglicht auch in sehr kleiner Menge die Oxydation von Stoffen, die allein nur langsam oder gar nicht oxydiert werden (12). Phenoloxydase katalysiert die Reaktionskette:

O_2 → Cupro → Cupri → Brenzkatechin → Orthochinon → Dihydropyridinnucleotid. (16)

Das Orthochinon könnte mit dem entstandenen Naphthohydrochinon reagieren. Wenn also Phenoloxydase in der Hefezelle die Reoxydation des Menadions katalysiert, so würde pro Zeiteinheit umso mehr Naphthohydrochinon oxydiert werden, je mehr Orthochinon zur Verfügung steht. Man müßte demnach eine Erhöhung der Chinon-Atmung durch Zusatz von Brenzkatechin erreichen können, es sei denn, es ist in der Zelle soviel Orthochinon vorhanden, daß die Phenoloxydase bereits gesättigt ist. Wenn Brenzkatechin die Chinon-Atmung steigert, so hat man damit einen Beweis, daß Phenoloxydase an der Reoxydation des Menadion beteiligt ist, fällt aber der Versuch negativ aus, so ist das kein Argument dagegen. Man muß dann auf einem anderen Weg entscheiden, ob eine Eisen- oder Kupferkatalyse vorliegt, und das ist möglich mit Hilfe des Kohlenmonoxyd. Beide Metallfermente werden durch Kohlenmonoxyd gehemmt, dabei bilden sich Eisen- bzw. Kupfercarbonylverbindungen. Diese unterscheiden sich dadurch voneinander, daß die Eisencarbonylverbindung im Licht dissoziiert (15), die Kupfercarbonylverbindung aber nicht. Daher ist die Hemmung einer Eisenkatalyse durch Kohlenmonoxyd im Licht reversibel, während eine

Kupferkatalyse im Licht und im Dunkeln im gleichen Ausmaß gehemmt wird (16).
Eine andere Substanz, die oxydierende Fermentsysteme, wie z.B. die Succinoxydase hemmt, ist das Antimycin A (11). Es wirkt schon in sehr niedriger Konzentration, der Mechanismus der Hemmung ist aber noch nicht bekannt. Das Antimycin A hat die Eigenschaften eines stickstoffhaltigen Phenols, seine empirisch gefundene Summenformel lautet: $C_{28}\ H_{40}\ O_9\ N_2$. Die Wirkung auf die Chinon-Atmung wurde aus zwei Gründen untersucht. Einmal hat man, wenn die durch Menadion induzierte Atmung durch Antimycin A gehemmt wird, eine weitere Bestätigung dafür, daß an der Reoxydation des Menadion ein Ferment beteiligt ist. Zum andern kann man vergleichen, ob sich die Chinon-Atmung der Hefezellen gegenüber dem Antimycin A genauso verhält wie z.B. die endogene oder die Glukose-Atmung.

Bevor das Menadion an der intakten Zelle katalytisch wirken kann, muß es in die Zelle eindringen, was durch passives Diffundieren geschehen kann. Bei dieser Diffusion muß nach einer gewissen Inkubationszeit im Zellinnern und im Zellüberstand die gleiche Konzentration an Menadion gefunden werden. Außerdem muß man am Überstand erkennen können, wie Menadion, bzw. Menadiol von der Zelle verändert worden ist, ob Chinon reduziert oder Hydrochinon oxydiert worden ist.

Faßt man nun die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit zusammen, so lauten sie:

1) Gelangt das Menadion aus dem Überstand einer Hefezellsuspension in das Zellinnere ?

2) In welchem Ausmaß verändert Menadion die endogene Atmung von Hefezellen, sowie die Veratmung von Zucker und Alkohol ?

3) Wird Menadion durch intakte Hefezellen fermentativ reoxydiert ?

4) Handelt es sich, wenn eine fermentative Reoxydation erfolgt, um eine Schwermetallkatalyse ?

Ergebnisse

1) Die Permeation des Menadion

a) Vergleich der Konzentrationen von Menadion im Zellinnern und im Überstand einer Hefezellsuspension.

Von einer Hefezellsuspension, der Menadion zugesetzt wurde, werden nach einer bestimmten Einwirkungszeit drei Spektren aufgenommen, und zwar vom Überstand der Zellen, vom Zellsaft nach dem Auffrieren und vom aethanolischen Extrakt der Zelltrümmer. (Abb. 1)

Zwei der Kurven, nämlich die des Überstandes (Kurve 1) und des Auszuges der Zelltrümmer (Kurve 2) zeigen sowohl die Absorptionsmaxima des Napnthochinons bei 260 bis 265 und 270 mμ, als auch die des Naphthohydrochinons bei 240 - 245 mμ. (4) Der Grad der Verdünnung ist in beiden Lösungen gleich, und, wie die Abbildung zeigt, haben die Extinktionen bei 240 - 245 mμ etwa denselben Wert, d.h. es liegt etwa dieselbe Konzentration an Hydrochinon vor. Das Spektrum des Zellsaftes (Kurve 3) entspricht dem des Hydrochinons. Da der Zellsaft wegen der hohen Eigenabsorption stärker verdünnt wurde als der Zellüberstand und der Zellextrakt, liegen bei Kurve 3 die Werte der Lichtschwächung niedriger als bei den beiden anderen Kurven.

Somit ist das Ergebnis: Im Extrakt aus Zelltrümmern und im Zellüberstand sind ungefähr gleiche Mengen Menadion enthalten. Das Menadion ist zum Teil reduziert worden.
Dieses Resultat gibt Anlaß zu der Frage, ob die Menge des reduzierten Chinons von der Zellzahl in der Suspension abhängig ist. Davon wird im folgenden Versuch berichtet werden.

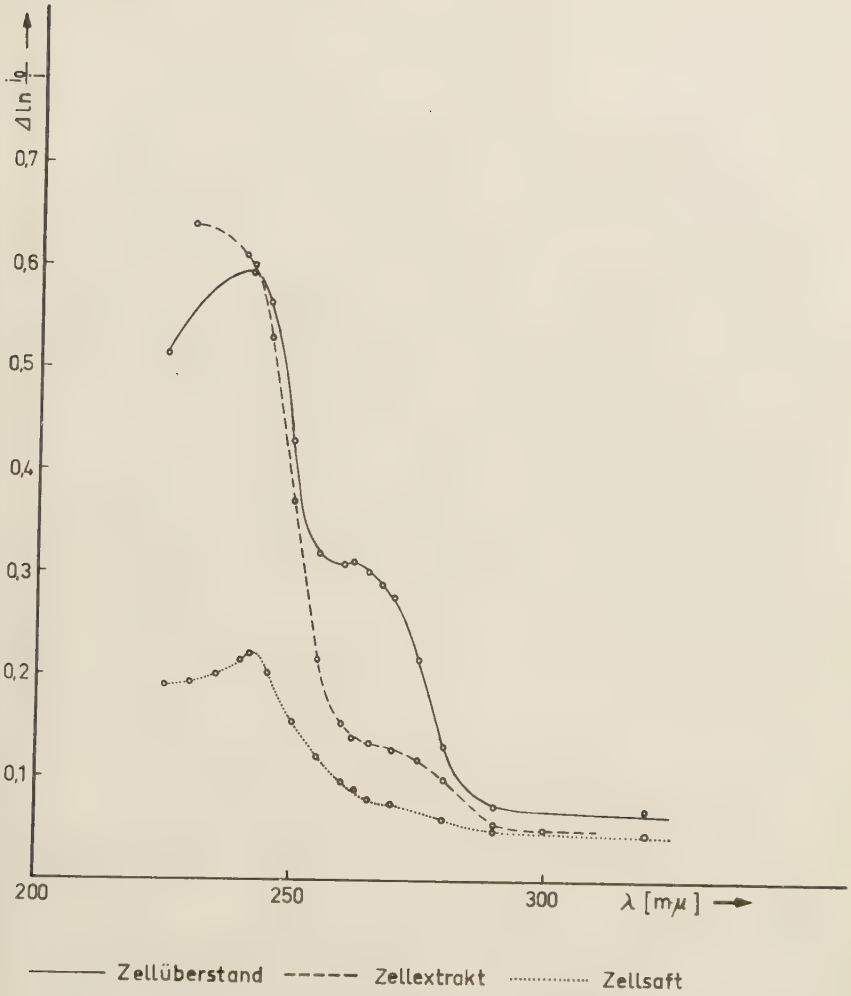


Abb.1: Absorptionskurven von Zellüberstand, äthanolischem Zellextrakt und Zellsaft einer Suspension von Hefezellen, der Menadion zugefügt wurde.

b) Chinon-Spektrum in Zellsuspensionen verschiedener Dichte.

Vier verschieden dichte Zellsuspensionen werden eine halbe Stunde lang mit Menadion inkubiert. Nach Hitzeinaktivierung und Abzentrifugieren der Zellen ergaben die Überstände die in Abb. 2 gezeigten Spektren. Dünne Suspensionen zeigen ein aus Chinon und Hydrochinon gemischtes Spektrum, bei dichteren Suspensionen entspricht die Absorptionskurve der des Hydrochinons. Die Differenz der Extinktionen nimmt mit zunehmender Zelldichte wegen der Eigenabsorption der Zellüberstände ab, da als Vergleichslösung jeweils der Überstand einer Zellsuspension gleicher Dichte benutzt wurde.
Der Versuch zeigt, daß Menadion in die Zellen gelangt, dort hydriert wird und aus den Zellen wieder herausläuft. Je dichter die Suspension ist, desto größer ist der Anteil des in der Versuchszeit gebildeten Hydrochinons.

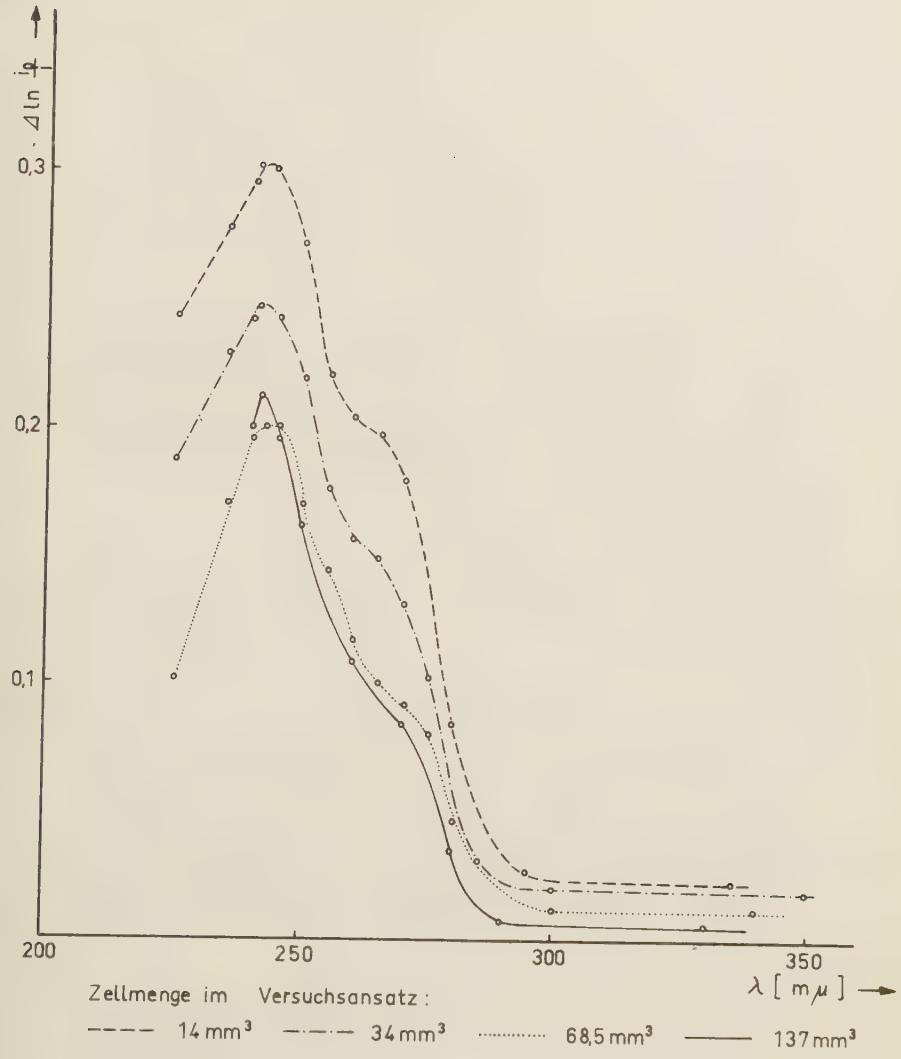


Abb.2: Absorptionskurven von vier Zellsuspensionen verschiedener Dichte, denen Menadion zugesetzt wurde. Die Konzentration des Menadion sowie seine Einwirkungszeit waren für alle Versuchsansätze gleich.

c) Quantitative Bestimmung des Hydrochinons.

Wenn die Annahme richtig ist, daß Chinon und Hydrochinon sich zwischen Zellinnerm und Medium passiv verteilen, dann muß es möglich sein, einen Teil des Chinons, das man einer anaerob gehaltenen Hefezellsuspension zugesetzt hat, im Überstand als Hydrochinon wiederzufinden, da das Chinon durch die Zellen enzymatisch reduziert wird. Es ist auch der umgekehrte Weg denkbar, daß man in Aerobiose Menadiol zusetzt und die Menge des von den Zellen fermentativ oxydierten Hydrochinons im Überstand mißt. Da hierbei aber die fermentative Oxydation mit der Autoxydation konkurriert, hätte dieser Versuch mehr Fehlermöglichkeiten, als wenn man vom Chinon ausgeht.

Das entstandene Hydrochinon läßt sich nach einer von KIESOW angegebenen Methode leicht bestimmen (8), es reagiert nämlich mit Kaliumferricyanid nach der Gleichung:

$$\text{Hydrochinon} + 2\left[Fe^{III}(CN)_6\right]^{3-} \longrightarrow \text{Chinon} + 2\left[Fe^{II}(CN)_6\right]^{4-} + 2\,H^{+}$$

Die Menge des dreiwertigen Eisens, die verbraucht wurde, läßt sich photometrisch bestimmen. Es wurden auf diese Weise nach zehn Minuten zwei Drittel der eingesetzten Chinonmenge als Hydrochinon im Überstand gefunden. (Protokoll 3)

2) Wirkung des Menadion auf die Atmung von Hefezellen.

a) Sauerstoffverbrauch und respiratorischer Quotient.

Der Sauerstoffverbrauch von Hefezellen, die in Phosphatlösung endogen atmen, wird auf das Sechsfache erhöht, wenn man Menadion zusetzt.

Tabelle 1

Sauerstoffverbrauch endogen atmender Hefezellen mit Menadion

Atmung	QO_2 $\left[\frac{mm^3\ O_2}{mg \cdot h}\right]$
Endogen	2,3 ± 0,4
Endogen mit Menadion	14,6 ± 1,2

Eine Suspension von Hefezellen in m/20 KH_2PO_4 wird in kastenförmige Manometrie-Gefäße gebracht, in deren zentraler Wanne sich 4 n Kalilauge befindet. Zuerst wird die endogene Atmung gemessen, danach werden aus dem Anhang 0,1 mg Menadion eingeschwenkt und wieder der Sauerstoffverbrauch bestimmt.

Der Mehrverbrauch von Sauerstoff setzt sofort ein und geht auch während längerer Versuchszeiten nur wenig zurück. Die längste hier verfolgte Zeitspanne betrug zwei Stunden. Atmen die Hefezellen in Phosphat-Glukose oder Phosphat-Alkohol, so verändert Menadion den Sauerstoffverbrauch der Glukose-Atmung nicht,

dagegen wird die Atmung in Phosphat-Alkohol um etwa 25% erhöht.

Tabelle 2

Wirkung von Menadion auf die Atmung von Hefezellen in Phosphat-Glukose und Phosphat-Alkohol.

Atmung in	$Q O_2$ $\left[\frac{mm^3 \; O_2}{mg \cdot h}\right]$	
	ohne Menadion	mit Menadion
Glukose	39,1	39,8
Alkohol	48,7	61,5

Die Hefezellen wurden in 3 ml m/20 $KH_2 PO_4$ und 2,2 g% Glukose bzw. 1% Äthylalkohol suspendiert und der Sauerstoffverbrauch in kastenförmigen Manometrie-Gefäßen gemessen. Kohlendioxyd wird durch Kalilauge in einer zentralen Wanne absorbiert. Aus der Birne werden 0,1 mg Menadion in den Hauptraum herübergeholt.

Die Versuche wurden in Warburg-Gefäßen mit Kalilauge ausgeführt. Ein Vergleich von Ein- und Zwei-Gefäß-methode ergab keinen Unterschied der Atmungsgrößen. Er zeigt außerdem, daß die Anwesenheit von Kohlendioxyd die Atmung mit Menadion nicht beeinflußt. Mit Hilfe der Zweigefäßmethode kann man ferner die respiratorischen Quotienten der endogenen Atmung mit und ohne Menadion berechnen. Beide haben denselben Wert.

Tabelle 3

Tabelle 3

Respiratorischer Quotient der endogenen Atmung mit Menadion.

Nr.	RQ	
	ohne Menadion	mit Menadion
1	o,84	o,81
2	o,70	o,90
3	o,93	o,78
4	o,78	o,77
5	o,78	o,91
Summe	4,03	4,17
Mittel-wert	o,81	o,82

Gleiche Mengen einer Hefezellsuspension werden in verschieden große, kastenförmige Warburg-Gefäße gefüllt. Aus den Druckänderungen läßt sich mit Hilfe der Gefäßpaarformel sowohl der O_2-Verbrauch, wie die CO_2- Entwicklung messen.

(siehe z.B. Protokoll 5).

b) Abhängigkeit von der Konzentration des Menadion.

Die geringste Konzentration an Menadion, bei der die größtmögliche Atmung beobachtet wird, ist 1,5 mg% oder $9. 10^{-5}$ molar. Die doppelte oder vierfache Menge Menadion erhöht den Sauerstoffverbrauch nicht weiter, unter 1,5 mg% ist die Atmungsgröße abhängig von der Konzentration des Menadion.

Tabelle 4

Abhängigkeit der Atmung von der Konzentration des Menadion.

Menadion mg%	$Q O_2$ $\frac{mm^3 \; O_2}{mg \; . \; h}$
-	2,3
o,15	9,6
o,70	11,3
1,5	16,2
3,0	14,6

Im Hauptraum der Manometriegefäße befindet sich die Hefezellsuspension in m/20 $KH_2 PO_4$. Die Birnen enthalten verschiedene Mengen Menadion.

c) Wirkung von Menadiol.

Wenn man der Zellsuspension 2-Methyl-1,4-Naphthohydrochinon zusetzt, so wird ebenfalls die Atmung erhöht, und zwar im selben Ausmaß wie mit Naphthochinon.

3) Beeinflussung der Menadion-Atmung.

Durch die Versuchsergebnisse dieses Abschnittes sollen zwei Fragen beantwortet werden, nämlich erstens: Geschieht die Reoxydation des Menadion fermentativ ? und zweitens: Liegt eine Schwermetallkatalyse vor ?

a) Wirkung von Antimycin A.

Antimycin A beeinflußt die endogene Atmung der Hefezellen nicht. Auch die durch Menadion induzierte Atmung wird von Antimycin A nicht gehemmt.

Tabelle 5

Endogene Atmung mit Antimycin und Menadion.

	QO_2 $\left[\frac{mm^3\ O_2}{mg \cdot h}\right]$	
	Endogen	Mit Menadion
Ohne Antimycin A	2,3	14,6
Mit Antimycin A	2,6	16,2

Im Hauptraum der Manometrie-Gefäße befinden sich die Hefezellsuspension und das Antimycin A. Nachdem der Sauerstoffverbrauch über etwa eine halbe Stunde gemessen wurde, wird aus der Birne Menadion herübergeholt und nach dem Druckausgleich die Messung der Atmung fortgesetzt. Die Werte der Atmung mit Antimycin A sind Mittelwerte aus fünf Versuchen, als Vergleichswerte der Atmung ohne Antimycin A wurden nochmals die Zahlen der Tabelle 1 aufgeführt.

Zum Vergleich wurde die Wirkung von Antimycin A auf Hefezellen untersucht, die in Phosphat-Glukose atmen. Hier trat eine Atmungshemmung ein, die mit der Zeit zunahm und nach einer halben Stunde 85% betrug.

Tabelle 6

Atmung in Glukose mit Antimycin A

Einwirkungszeit des Antimycin (min)	Q_{O_2} ohne Antimycin	$\left[\frac{mm^3\ O_2}{mg \cdot h}\right]$ mit Antimycin	Hemmung der Atmung %
5 - 35	44,7	28,2	37
35 - 65	44,3	6,4	85

Hefezellen werden im Hauptraum zweier Manometrie-Gefäße in m/20 $KH_2\ PO_4$ und 2,2g% Glukose suspendiert. Die zentralen Wannen enthalten Kalilauge. Nach dem Druckausgleich wird Antimycin A aus der Birne des einen Gefäßes in den Hauptraum herübergeholt, im Kontrollgefäß enthielt die Birne nur Phosphat. Die Atmung der Zellen wurde in Abständen von 5 Minuten gemessen.

b) Kaliumcyanid

Die Chinon-Atmung der Hefezellen läßt sich durch Kaliumcyanid hemmen, was man auf zweierlei Weise beobachten kann. Einmal, indem man die Atmung der Zellen und ihre Blausäurehemmung mit der Zweigefäßmethode mißt. Die Ergebnisse zeigt Abb. 3. Die andere Methode beruht wiederum darauf, daß Hydrochinon mit Kaliumferricyanid reagiert. Aus den Versuchen von KIESOW war bekannt, daß anaerob gehaltene Hefezellen, denen man Menadion und Kaliumferricyanid zusetzt, sehr rasch das koordinativ gebundene dreiwertige Eisen zu zweiwertigem Eisen reduzieren, während ohne Menadion die Geschwindigkeit der Reduktion nur gering ist (8). Kaliumferricyanid allein hat, wie in Vorversuchen geprüft wurde, keine Wirkung auf den Stoffwechsel der Zellen. Auf Grund der erwähnten Versuche in Anaerobiose lag es nahe, anzunehmen, daß nicht nur beim Entzug des Sauerstoffs, sondern auch bei Hemmung der Atmung eine Reduktion von dreiwertigem Eisen einsetzen würde, wenn Menadion zugegen ist. Abb. 4 zeigt, daß diese Vermutung sich bestätigen ließ. Die Menge des reduzierten Eisens, die photometrisch bestimmt wird, ist proportional der Hemmung der fermentativen Reoxydation des Chinon durch Blausäre. Das beruht darauf, daß die Reoxydation des Naphthohydrochinon auf zwei Wegen geschehen kann, nämlich einerseits enzymatisch durch Sauerstoff und andererseits durch Reduktion von koordinativ gebundenem dreiwertigen Eisen. Bei nicht gehemmter Atmung wird der weitaus überwiegende Teil des Hydrochinons durch Sauerstoff oxydiert. Ist dieser Weg durch die Blausäure-Hemmung der Atmung ganz oder teilweise versperrt, so wird entsprechend mehr Hydrochinon durch Reduktion von Kaliumferricyanid oxydiert. Man hat daher sowohl in der Verminderung des Sauerstoffverbrauchs wie auch in der Erhöhung der Reduktion von Kaliumferricyanid ein Maß für die Blausäurehemmung der Chinon-Atmung. Als Mittelwert aus photometrischer und manometrischer Messung ergibt sich eine 50%ige Hemmung der Menadion-Atmung durch 10^{-4} molar Kaliumcyanid. Durch 10^{-3} molar Kaliumcyanid wird die Chinon-Atmung zu 95% gehemmt.

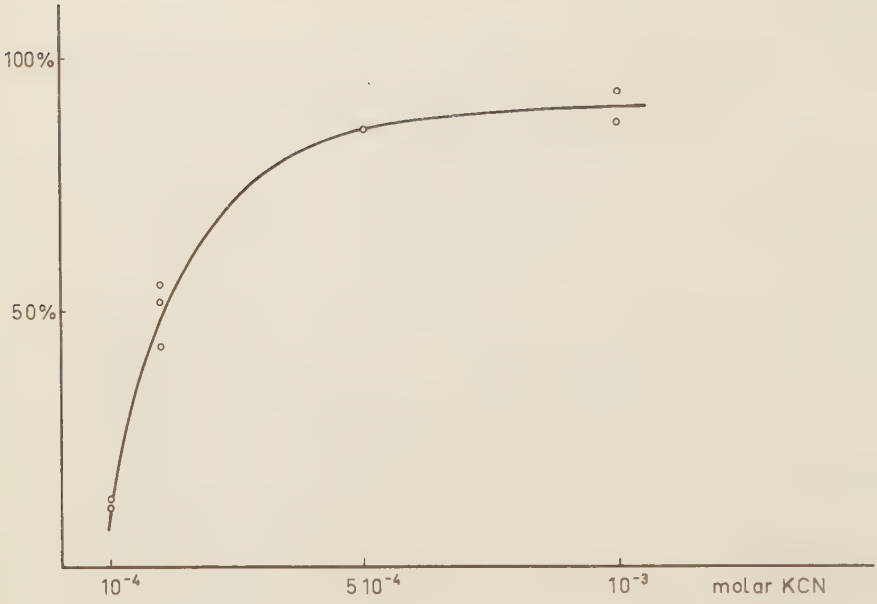


Abb. 3: Hemmung der Chinon-Atmung von Hefezellen durch Kaliumcyanid. Die Atmung wurde mit der Zweigefäßmethode der Manometrie gemessen, wobei in verschieden große, kastenförmige Gefäße gleiche Mengen einer Hefezellsuspension eingefüllt wurden. KCN und Menadion wurden nacheinander aus den beiden Anhängen der Gefäße in den Hauptraum eingeschwenkt. Die Konzentration des Menadion war 9.10^{-5} molar.

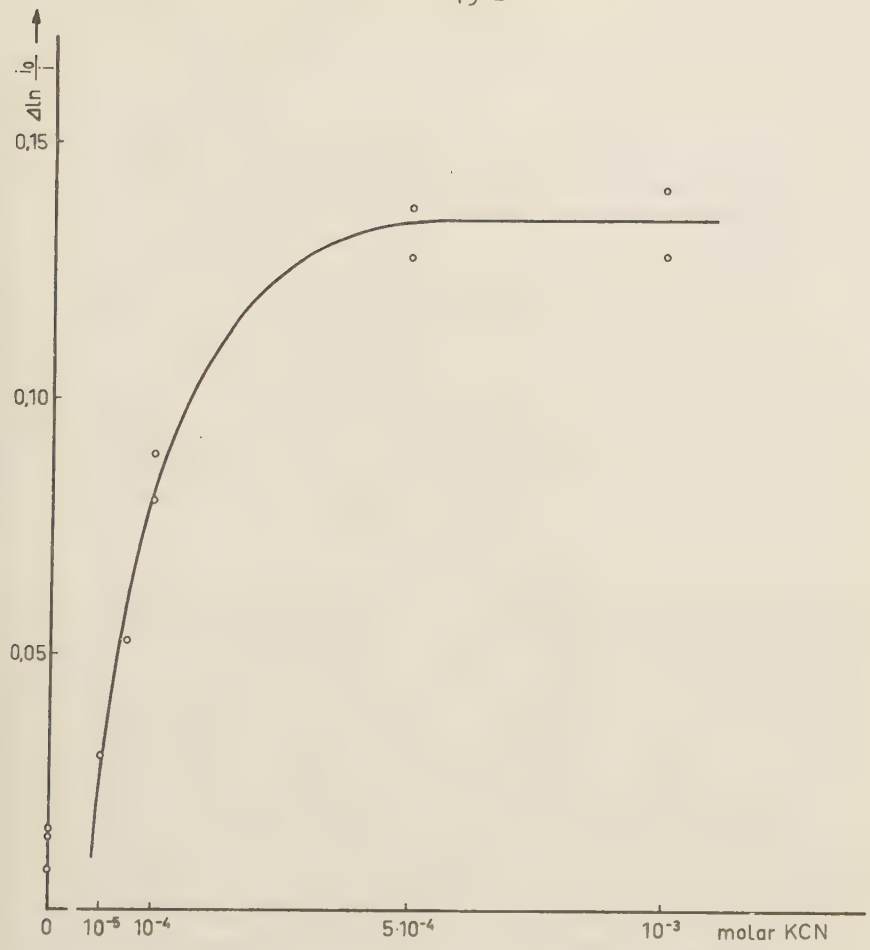


Abb. 4: Reduktion von Kaliumferricyanid durch Hefezellen in Gegenwart von Menadion bei Hemmung der Atmung durch steigende Konzentrationen von Kaliumcyanid. Als Maß für die Reduktion des Kaliumferricyanid dient die Abnahme der Extinktion bei 300 mμ. Die Hefezellsuspension enthält außer dem KCN Menadion 2.10^{-4} molar sowie 170 mg% Kaliumferricyanid.

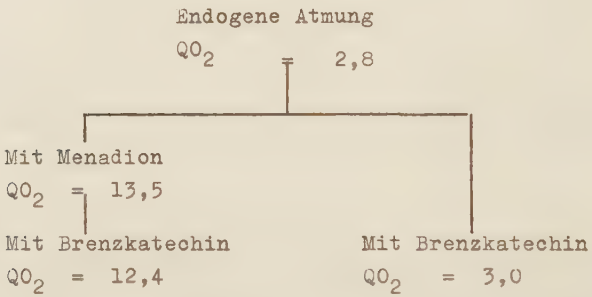
c) Brenzkatechin

Brenzkatechin erhöht, wie Tabelle 7 zeigt, die Chinon-Atmung der Hefezellen nicht. Auch auf die endogene Atmung hat es keine Wirkung.

Tabelle 7

Wirkung von Brenzkatechin auf die endogene Atmung mit Menadion.

$$QO_2 = \left[\frac{mm^3 \; O_2}{mg \cdot h}\right]$$



Im Hauptraum zweier Warburg-Gefäße befinden sich 3 ml einer Suspension von Hefezellen in Phosphat und außerdem o,1 mg Menadion in einem der Kästen.
Es wird der O_2-Verbrauch für t=30 min gemessen und danach aus den Birnen beider Gefäße 0,1 mg Brenzkatechin eingeschwenkt, was im Versuchsansatz einer Konzentration von 3.10^{-4} molar entspricht. Die Druckänderungen geben den O_2-Verbrauch an, da CO_2 durch Kalilauge absorbiert wird.

d) Kohlenmonoxyd

Läßt man in Phosphat suspendierte Hefezellen mit Menadion in einem Gasgemisch atmen, das 95% Kohlenmonoxyd und 5% Sauerstoff enthält, so wird die durch Menadion induzierte Atmung im Dunkeln etwa zur Hälfte gehemmt. Im Licht erreicht sie dagegen fast den normalen Wert. Abb. 5 zeigt den Verlauf eines solchen Versuches. Die Atmungsgrößen gibt Tabelle 8 an.

Tabelle 8

Wirkung des Kohlenmonoxyd auf die Chinon-Atmung bei Licht und im Dunkeln.

Belichtung t = 10 min	Q_{O_2} $\left[\frac{mm^3\ O_2}{mg \cdot h}\right]$ bei		Hemmung der Atmung %
	95% Argon 5% O_2	95% CO 5% O_2	
dunkel	13,6	6,9	49
hell	14,4	12,4	14
dunkel	12,9	7,0	41
hell	12,9	12,4	3

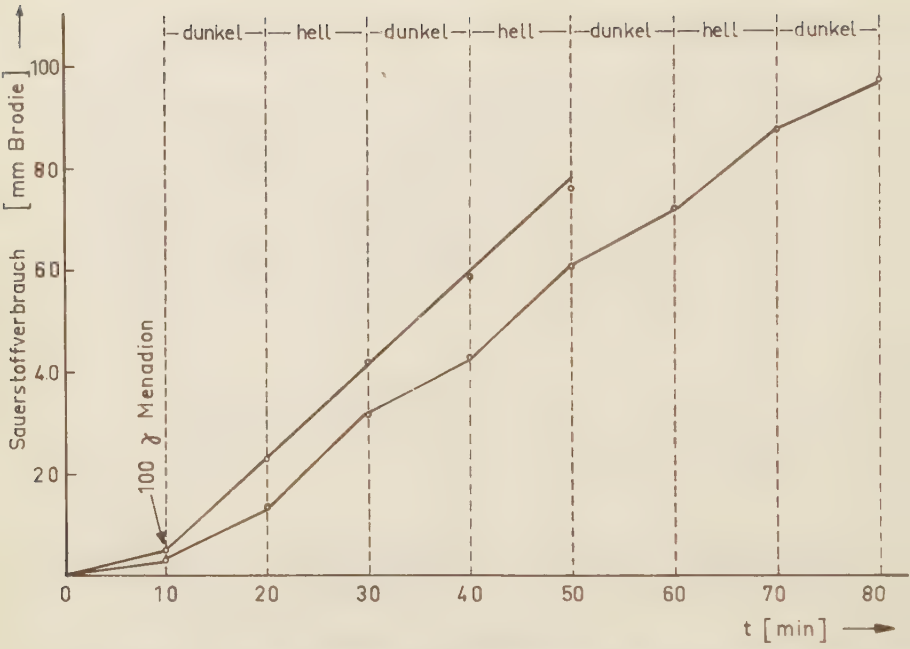


Abb. 5: Die Wirkung von Kohlenmonoxyd auf die Chinonkatalyse
Zwei gleich große Manometriegefäße enthalten in den Haupträumen 3 ml Zellsuspension (Kulturhefe in Phosphatlösung) und in den Birnen gleiche Mengen 2-Methyl-1,4-Naphthochinon. Im Gefäß 1 ist die Gasphase 95% CO und 5% O_2, im Gefäß 2 95% Argon und 5% O_2. Bei t=10 min wird das Chinon in die Haupträume gegeben und nach jeweils 10 min im Dunklen und im Licht die Druckänderung abgelesen. Da die Gefäße KOH in der zentralen Wanne enthalten, sind die Druckänderungen der Sauerstoffverbrauch. Druckänderungen, die durch CO-Absorption in der Kalilauge verursacht werden, sind sehr klein und werden durch ein Kontrollgefäß eliminiert.

Zusammenfassung der Ergebnisse

1.) Menadion und Menadiol verteilen sich in Hefezellsuspensionen gleichmäßig im Zellinnern und Zellüberstand.

Von der gleichen Menge 2-Methyl-1,4-Naphthohydrochinon wird umso mehr zum Chinon oxydiert, je mehr Zellen vorhanden sind.

Menadion, das man anaerob gehaltenen Hefezellen zusetzt, findet man nach 10 Minuten zu zwei Dritteln als Hydrochinon im Überstand der Suspension.

2.) Menadion 9.10^{-5} molar steigert die endogene Atmung von Hefezellen auf das Sechsfache. Unterhalb dieser Konzentration ist die durch Menadion induzierte Atmung konzentrationsabhängig, eine größere Menge Menadion bewirkt keine weitere Steigerung der Atmung.

3.) Brenzkatechin 3.10^{-4} molar hat keinen Einfluß auf die Größe der Chinon-Atmung. Die durch Menadion induzierte Atmung läßt sich durch Antimycin A nicht hemmen. Sie ist hemmbar durch Kaliumcyanid und Kohlenmonoxyd. Die Hemmung mit Kohlenmonoxyd hat die Eigenschaft der Photodissoziation.

Diskussion

1.) Die Hemmung der Chinon-Atmung durch Kaliumcyanid und Kohlenmonoxyd.

Bei den Versuchen mit Kaliumcyanid könnte man aus den Werten der manometrischen Messung allein zunächst nur schließen, daß in der Oxydoreduktion, die das Menadion in der Hefezelle eingeht, ein blausäureempfindlicher Vorgang gehemmt wird. Um auszuschließen, daß dieser Vorgang die fermentative Reduktion ist, muß man ein Ergebnis von KIESOW benutzen (8), der festgestellt hat, daß das Chinon reduzierende Ferment durch 10^{-2} molar Kaliumcyanid erst zu 50% gehemmt wird. Die Verminderung der Sauerstoffaufnahme durch 10^{-4} molar Kaliumcyanid wird demnach durch die Hemmung des Chinon reoxydierenden Fermentes verursacht. Dieses Resultat wird bestätigt durch die photometrischen Messungen mit Kaliumferricyanid, bei denen man ja beobachtet, daß das Hydrochinon zwar gebildet, aber nicht mehr über den enzymatischen Weg durch Sauerstoff oxydiert wird, sondern stattdessen durch das dreiwertige Eisen des Ferricyanids.

Die Hemmbarkeit durch Kaliumcyanid zeigt außerdem, daß es sich bei der Reoxydation des Menadions um eine Schwermetallkatalyse handelt. Es war danach zu erwarten, daß sie auch durch Kohlenmonoxyd gehemmt wird. Diese Hemmung ist im Licht reversibel und wie WARBURG gezeigt hat (15), ist die Photodissoziation eine Eigenschaft der Eisenkatalyse und zwar des sauerstoffübertragenden Fermentes. Die fermentative Reoxydation des Menadion geschieht demnach durch das sauerstoffübertragende Ferment der Atmung.

2.) Antimycin A und die durch Menadion induzierte Atmung.

Antimycin A hemmt in niedriger Konzentration das Menadion reoxydierende Ferment, das von COLPA-BOONSTRA und SLATER in Mitochondrien von Herzmuskelzellen gefunden wurde (1). Bei Hefezellen läßt sich diese Hemmung der Reoxydation nicht nachweisen. Es besteht jedoch bei Versuchen mit Antimycin A eine Schwierigkeit darin, daß es sich in Phosphat oder reinem Wasser schlecht löst. Gut löslich ist es in Äthylalkohol (11), den man aber zu Versuchen mit der endogenen und der Chinon-Atmung nicht benutzen kann. Es wäre also einzuwenden, daß infolge der schlechten Löslichkeit des Antimycin A nicht genügend davon in die Zelle eingedrungen ist, um eine Atmungshemmung hervorzurufen. Dagegen ist zu sagen, daß ja bei den Versuchen mit der Glukose-Atmung dieselbe Menge der Substanz auch in Phosphat gelöst wurde und wirksam war.

Aus der Tatsache, daß die Glukose-Atmung der Hefezellen durch Antimycin A gehemmt wird, die Menadion-Atmung aber nicht, ergibt sich, daß die Chinonkatalyse gegen Antimycin A unempfindlich ist. Man wird aus dem Versuchsergebnis weiter folgern, daß die Erhöhung der Atmung bei Zusatz von Menadion nicht durch eine vermehrte Verbrennung von Glukose über den Cytochromweg verursacht wird, und daß die antimycinempfindliche Reaktion des Cytochromweges durch die Chinonkatalyse umgangen wird.

3.) Der durch Menadion induzierte Sauerstoff-Verbrauch.

Es ist nicht klar, welches Substrat die endogene Atmung hat. STICKLAND (13) stellte fest, daß dabei der Polysaccharidgehalt von Kulturhefezellen nicht vermindert wird. Der hier gefundene respiratorische Quotient (0,82) stimmt mit dem von ihm angegebenen (0,85) etwa überein. Er hat nach dem Hinzufügen von Menadion denselben Wert. Das Substrat der Menadion-Atmung müßte demnach dasselbe sein wie das der endogenen Atmung.

Als Ursache für den Mehrverbrauch von Sauerstoff in Gegenwart von Menadion kann man vermuten, daß ein bei der endogenen Atmung gehemmter Schritt des Cytochromweges durch die Chinonkatalyse umgangen wird. Möglicherweise handelt es sich dabei um eine Reaktion, die von der Bindung der Orthophosphorsäure abhängig ist. Die Chinonkatalyse würde also einen Nebenweg des Cytochromweges darstellen, bei dem der Wasserstoff eines Reduktionsmittels auf das Chinon übertragen wird, das dann direkt durch das sauerstoffübertragende Ferment reoxydiert wird. Als Reduktionsmittel des Chinons könnte das hydrierte Di- bzw. Triphosphopyridinnukleotid dienen. Diese Annahme wird dadurch gestützt, daß die 50%ige Hemmung der Chinonreduktion durch 10^{-2} molar Kaliumcyanid erfolgt (8), das ist eine Konzentration, bei der sich Additionsverbindungen zwischen den Pyridinnukleotiden und Kaliumcyanid bilden. Es ist weiter denkbar, daß die Pyridinnukleotide durch Wasserstoffaufnahme aus dem Horrecker-Cyklus hydriert werden.

4.) Die Bedeutung des Chinon reoxydierenden Fermentes im Stoffwechsel der Zelle.

Läßt man Hydrochinon an Luft stehen z.B. in einer Phosphatlösung von pH 4,6, so autoxydiert es sich langsam. Dabei stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Chinon und Hydrochinon ein, das ganz auf der Seite des Chinons liegt. Da die Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichts bei pH 4,6 langsam erfolgt, kann eine enzymatische Beschleunigung von Reduktion oder Oxydation zu einer scheinbaren Abweichung von diesem Gleichgewicht führen. Wenn z.B. in der Hefezelle nur die Reduktion des Chinon enzymatisch vor sich ginge, so wäre, wegen der unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten von fermentativer Reduktion und Autoxydation, fast ausschließlich Hydrochinon vorhanden. Dadurch, daß auch die Oxydation enzymatisch geschieht, wird das Gleichgewicht zugunsten des Chinons verschoben. Dies wirkt sich wiederum auf die Gärung der Hefezellen aus, denn durch die Chinonkatalyse wird die Gärung der Zellen gehemmt, und zwar ist dazu die oxydierte Form, das Chinon notwendig (6). Die Bedeutung des reoxydierenden Fermentes liegt somit darin, daß es als Bestandteil der Chinonkatalyse regulierend auf die Gärung der Hefezellen einwirkt.

Die Frage, welchen Vorgang der Gärung das Chinon hemmt, muß man dahingehend beantworten, daß ein Angriffspunkt des Chinons das erste phosphorylierende Ferment der Gärung, die Hexokinase ist. Die Aktivität dieses Fermentes kann man an der intakten Zelle messen, indem man die Phosphorylierung von 2 - Desoxyglucose bestimmt (7). Man findet sie in Gegenwart von Menadion herabgesetzt (8). Auch die Aktivität isolierter reiner Hexokinase wird um etwa ein Drittel vermindert, wenn man der Versuchslösung Menadion zusetzt und es eine halbe Stunde lang einwirken läßt (eigene Versuche, Protokoll 10).

Sowohl in vivo wie in vitro wird also die Phosphorylierung der Glukose durch Menadion gehemmt. Ob es noch ein anderer Punkt der Gärung ist, an dem die Chinonkatalyse

angreift, läßt sich bis jetzt nicht entscheiden.

Vorgänge, die, wie die Chinonkatalyse, die Gärung der Hefezellen hemmen, sind deshalb von Interesse, weil die hohe Gärung der Hefezelle eine Eigenschaft ist, die sie gemeinsam hat mit der Krebszelle. Der Anstieg der Gärungsgröße ist sogar die erste meßbare Veränderung des Stoffwechsels bis dahin normaler Zellen, aus denen unter bestimmten Bedingungen Krebszellen werden, wie es von O. WARBURG, K. GAWEHN und A.-W. GEISSLER an trypsinierten Zellen von Kaninchennieren und Hühnerembryonen beobachtet wurde (17). Auch bei Hefezellen entsteht die hohe Gärung dann, wenn sie aus einem Milieu, in dem sie langsam wachsen, in ein solches kommen, in dem sie rasch wachsen können (5).

Die Gärung von Krebszellen und Hefezellen zeigt demnach das gleiche Verhalten, nämlich ein Ansteigen beim Übergang vom normalen zum Krebsstoffwechsel, bzw. beim Übergang vom langsamen zum schnellen Wachstum.

Die gleichzeitige Erhöhung von Gärung und Wachstum der Hefezellen weist auf den Zusammenhang zwischen beiden Vorgängen hin, und zwar ist die Wachstumsgeschwindigkeit bedingt durch die Gärungsgröße (6). Man kann deswegen auch die Hemmung beider Vorgänge durch Chinon mit derselben Kurve wiedergeben (6). Bei Tumorzellen besteht dieser Zusammenhang ebenfalls, denn wie HOLZER und Mitarbeiter fanden, hemmen carcinostatisch wirksame Chinone die Glykolyse der Tumorzellen (2).

Da man also, in bezug auf Gärung und Wachstum, die Hefezelle als Modell der Krebszelle ansehen kann, ist zu erwarten, daß Substanzen, die wie das Menadion beide Vorgänge an der Hefezelle hemmen, die gleiche Wirkung auf Krebszellen haben.

An Mäuse-Ascites-Zellen ist durch H. TIEDEMANN und Mitarbeiter auch bereits nachgewiesen worden, daß 2-Methyl-1,4-Naphthochinon die Tumorglykolyse hemmt (14).

Wenn die Vermutung zutrifft, daß die Chinonkatalyse auch an der Krebszelle wirksam ist und deren Gärung hemmt, so ist als Ursache dafür denkbar, daß in einer Zelle mit normalem Stoffwechsel infolge der fermentativen Reoxydation genügend freies Chinon vorhanden ist, um die Gärung niedrig zu halten, daß aber beim Entstehen des Krebsstoffwechsels entweder nicht mehr genügend freies Chinon gebildet wird, um die Gärung zu regulieren, oder daß die Gärung gegen die gleiche Menge Chinon "unempfindlicher" geworden ist und für denselben Effekt mehr Chinon benötigt wird. Um die erhöhte Gärung und damit das Wachstum zu vermindern, müßte man Chinon zuführen und dafür sorgen, daß das von den Zellen hydrierte Chinon reoxydiert wird. Der Modellversuch dafür wurde an Hefezellen bereits durchgeführt (8). Die Hemmung der Gärung durch Chinon, die sonst nur in Gegenwart von Sauerstoff möglich ist, kann man auch in Anaerobiose erreichen, wenn man dreiwertiges Eisen zufügt. Die Gärung bleibt dann solange niedrig, wie dreiwertiges Eisen zur Oxydation des Hydrochinon vorhanden ist. Wendet man dieses Ergebnis auf Tumorzellen an, so bedeutet es, daß man die intrazelluläre fermentative Reoxydation, wenn sie zu gering oder unwirksam geworden ist, ersetzen kann durch die extrazelluläre nichtenzymatische chemische Oxydation. Es ist denkbar, daß man auf diese Weise die Gärung und das Wachstum von Tumorzellen hemmen kann. Das Kaliumferricyanid allein ist unwirksam, da es nicht in die Zelle eindringt. Sowohl Chinon als auch Hydrochinon diffundieren aber durch die Zellwand. Mit Menadion und dreiwertigen Eisen zusammen kann man somit in den Stoffwechsel der intakten Zelle eingreifen.

Zusammenfassung:

Es wurde untersucht, ob das einer Hefezellsuspension zugesetzte und enzymatisch reduzierte Menadion auch fermentativ reoxydiert wird. Da die Versuche in Suspensionen intakter Hefezellen durchgeführt wurden, war es notwendig, zunächst festzustellen, ob und in welchem Ausmaß Menadion und Menadiol aus dem Medium in das Zellinnere eindringen. Die aufgenommenen Absorptionsspektren zeigten etwa die gleiche Konzentration des Menadion und Menadiol im Zellinnern und im Zellüberstand. Es wurde dann der Einfluß verschiedener Substanzen auf die Menadion-Atmung der Hefezellen geprüft. KCN hemmt in einer Konzentration von 10^{-4} molar die Chinon-Atmung zu 50%, während die fermentative Reduktion des Chinons erst durch 10^{-2} molar KCN zu 50% unterbunden wird (8). Kohlenmonoxyd bewirkt ebenfalls eine Hemmung der Chinon-Atmung, diese Hemmung zeigt Photodissoziation.

Aus den Versuchsergebnissen wird gefolgert, daß die Reoxydation des 2-Methyl-1,4-Naphthohydrochinons fermentativ geschieht und ferner, daß es sich um eine Schwermetallkatalyse handelt. Die Photodissoziation ist eine Eigentümlichkeit der Eisenkatalyse, und zwar des sauerstoffübertragenden Fermentes der Atmung, und demnach geschieht die fermentative Reoxydation des Chinons durch das Warburg'sche Atmungsferment.

Eine mögliche Bedeutung der fermentativen Reoxydation des Chinons liegt darin, daß die Chinonkatalyse die Gärung von Hefezellen hemmt, wozu die oxydierte Form des Chinons notwendig ist (6). Da die Hefezelle in bezug auf Gärung und Wachstum als Modell der Krebszelle angesehen werden kann, wird eine Beeinflussung des malignen Tumorwachstums durch die oxydierte Form des Chinons diskutiert.

I. Material

1.) Hefe

Es wurde Kulturhefe "Germania Bäcker-Hefe, Stamm A" der Norddeutschen Hefeindustrie verwendet, die dreimal in Wasser auf der Zentrifuge gewaschen wurde. Das Material war frisch und wurde zwischen den Versuchen im Kühlschrank bei + 4° C aufbewahrt.

2.) Menadion

2-Methyl-1,4-Naphthochinon der Fa. "Merck" wurde in Methylglykol gelöst und danach auf die doppelte Menge mit m/20 KH_2 PO_4 aufgefüllt. Die Konzentration in dieser Lösung betrug 10,5 mg pro 10 ml. Davon wurden in einem Versuch mit 3 ml Zellsuspension 50 - 200 µl, entsprechend 52 - 210 γ Menadion verwandt, so daß eine Konzentration von 1,5 - 6 mg% erreicht wurde.
2-Methyl-1,4-Naphthohydrochinon der Fa. "Merck" wurde genauso gelöst und in derselben Konzentration angewandt.

3.) Methylglykol (Äthylenglykolmonomethylaether)

Das Methylglykol wurde öfter redestilliert, da es sich spontan zersetzt. Der dabei entstehende Alkohol stört bei Versuchen mit der endogenen Atmung. In einem Versuchsansatz waren jeweils höchstens 3% Methylglykol als Endkonzentration enthalten, wovon der Stoffwechsel der Hefezellen nicht verändert wird.

4.) Antimycin der Firma "Serva" wurde in reinem Wasser oder m/20 KH_2 PO_4 aufgenommen und löste sich darin erst nach intensivem Rühren. Die Stammlösung wurde für höchstens 2 Tage bei + 4° C aufbewahrt. Sie enthielt 175 γ pro ml Lösungsmittel. Davon wurden 0,1 ml zu 3,1 ml Versuchsansatz gegeben. Die End-

konzentration war demnach 5,5 - 11 γ pro ml oder, nach der empirisch gefundenen Summenformel, 10^{-5} bis 2 x 10^{-5} molar.

5.) Brenzkatechin

Von Brenzkatechin wurden 5 mg in 50 ml Wasser gelöst. Davon wurden 0,1 ml zu 3,1 ml Hefe-Suspension gegeben. Die Konzentration bei den Versuchen war demnach 3 mg% bzw. 3.10^{-4} molar.

6.) Kohlenmonoxyd

Kohlenmonoxyd wurde aus Ameisensäure und Schwefelsäure hergestellt (3) und im Verhältnis 19 : 1 mit Sauerstoff gemischt.

II. Methoden

1.) Manometrie

Für die manometrischen Messungen wurde die Ein- und Zweigefäßmethode angewandt. Die Tröge waren kastenförmig. Für die Eingefäßmethode wurden Kästen mit einer Birne benutzt, die außerdem eine zentrale Wanne zur Aufnahme von Kalilauge besaßen. Die für die Zweigefäßmethode verwendeten Tröge hatten zwei Anhänge, einen mit massivem Stopfen und einen mit Ventilstopfen. Es wurde das gleiche Flüssigkeitsvolumen in verschieden große Kästen gefüllt.

Die Versuchstemperatur hielt ein Thermostat auf 20° C. Die Volumina und Konstanten der Gefäße waren für 20° C bei der Eingefäßmethode:

Gefäß 18 an Manometer 5
V = 20,71 ml V_F = 3,4 ml K_{O_2} = 1,623 mm^2

Gefäß 21 an Manometer III
V = 19,62 ml V_F = 3,4 ml K_{O_2} = 1,522 mm^2

Gefäß 22 an Manometer I
V = 19,22 ml V_F = 3,4 ml K_{O_2} = 1,484 mm^2

Bei der Zweigefäßmethode:

Gefäß 9 an Manometer 1
V = 18,15 ml V_F = 7,2 ml

Gefäß 10 an Manometer 2
V = 29,97 ml V_F = 7,2 ml

$$XO_2 = H' \times 5{,}5 - H \times 9{,}17$$

$$XCO_2 = -H' \times 7{,}04 + H \times 14{,}49$$

H' bedeutet die Druckänderung in Gefäß 9.

Die Dauer der Messungen betrug 60 - 90 Minuten. Bei der Eingefäßmethode wurde mit einer Frequenz von v = 200/min und einer Amplitude ε von 1,4 cm geschüttelt, bei der Zweigefäßmethode war

V = 200/min und ε = 1,4 cm.

Die Hefe wurde vor Versuchen mit der endogenen Atmung eine Stunde lang in einer Waschflasche mit Sauerstoff durchgast, die Messungen sind also an verarmter Hefe gemacht worden.
Sollte die Alkohol-Atmung gemessen werden, so wurde die Hefesuspension in m/20 KH_2 PO_4 mit 1% Aethylalkohol eine Stunde an Luft geschüttelt, danach wurden die Zellen abzentrifugiert und nochmals in frischer Phosphat-Alkohol-Lösung suspendiert.

Zu den Messungen der Glukose-Atmung war keine Vorbereitung notwendig, die Zellen wurden in m/20 KH_2 PO_4 mit 1,1 oder 2,2 g% Glukose suspendiert. Vor Beginn der Messungen und nach dem Herüberholen der Substanzen aus den Anhängen wurde der Druckausgleich in den Thermobarometern abgewartet.

Bei den Versuchen mit Menadiol ist zu berücksichtigen, daß das Hydrochinon autoxydabel ist. Um den dadurch verursachten Mehrverbrauch von Sauerstoff zu messen, wurde ein Kontrollgefäß mit Menadiol in Phosphat-Lösung angesetzt. Zu einem Versuch braucht man also vier Gefäße, nämlich zwei für die Zellsuspensionen ohne und mit 2-Methyl-1,4-Naphthohydrochinon und zwei für die entsprechenden Ansätze ohne Zellen.

2.) Zelltrockengewicht

Durch Zentrifugieren in Zytokrit-Röhrchen wurde das Zellvolumen bestimmt. Daraus erhält man das Trockengewicht mit hinreichender Genauigkeit, indem man den Wert des Zytokrit mit 0,26 multipliziert.

3.) Photometrie

Es wurde das Zeiss-Spektral-Photometer verwandt. Die Schichtdicke d betrug 1 cm.

Kaliumferricyanid wurde bei einer Wellenlänge $\lambda = 300$ mμ bestimmt. Die Absorption gleichzeitig vorhandenen Chinons ist bei dieser Wellenlänge gering und wird durch eine Kontrollkuvette eliminiert.

Der Extinktionskoeffizient des Kaliumferricyanid in 0,8 n H_2SO_4 bei 20° C ist für $\lambda = 300$ mμ und d = 1 cm:

$$\varepsilon = 1{,}61 \quad \left[\frac{cm^2}{Mikromole}\right] \qquad (1).$$

4.) Auffrieren der Hefezellen

Die Zellsuspension wird aus dem Warburg-Gefäß in ein Zentrifugen-Röhrchen umgefüllt und rasch in flüssigen Stickstoff gebracht. Nach 30 Minuten wird sie aufgetaut und nochmals für dieselbe Zeit eingefroren. Wenn sie dann wieder aufgetaut ist, werden auf der Stock-Zentrifuge mit 1500 g die Zelltrümmer vom Zellsaft getrennt.

III. Protokolle

Protokoll 1

Chinon-Spektrum im Zellinnern und Zellüberstand.

Zu 50 ml einer Lösung von m/20 KH_2 PO_4 mit 2,2 g% Glukose und 10 mg% Menadion in einer Waschflasche werden etwa 100 mm^3 Zellen pro ml gegeben. Der Kontrollansatz enthält kein Menadion. Beide Suspensionen werden 30 Minuten mit Sauerstoff durchgast, danach werden je 20 ml zentrifugiert und der Überstand (1) aufgehoben. Nach Aufschließen der Zellen in flüssigem Stickstoff werden durch nochmaliges Zentrifugieren Zelltrümmer und Zellsaft getrennt. Der Zellsaft wird, da er stark getrübt ist, 1 : 8 mit m/20 KH_2 PO_4 verdünnt. (2). Die Zelltrümmer werden auf 20 ml mit 95%igen Aethanol aufgefüllt und 30 Minuten geschüttelt. (3)

Zur photometrischen Messung werden je 0,2 ml der Ansätze 1 - 3 mit 3,0 ml Wasser verdünnt und gegen den jeweiligen Kontrollansatz die Absorptionskurve aufgenommen. (Abb. 1)

Protokoll 2

Chinon-Spektrum in Zellsuspensionen verschiedener Dichte.

Von vier verschieden dichten Suspensionen mit 5 mg% Menadion werden je 2 ml in kegelförmigen Warburg-Gefäßen 30 Minuten in Luft geschüttelt.

Zytokrite: Suspension I : 14 mm^3 Zellen
II : 34 mm^3 Zellen
III : 68,5 mm^3 Zellen
IV : 137 mm^3 Zellen .

Zur Inaktivierung werden die Gefäße 5 Minuten in siedendes Wasser gehalten. Nach dem Abzentrifugieren werden 0,2 ml des Überstandes mit 3 ml Wasser verdünnt und davon die Absorptionskurven aufgenommen (Abb. 2). Den Vergleichswert bilden Suspensionen gleicher Zellzahl ohne Menadion.

Protokoll 3

Quantitative Bestimmung des Hydrochinons.

In einem Manometrie-Gefäß werden zu 3 ml einer Zellsuspension in m/20 KH_2PO_4 und 1,1 g% Glukose mit 122 mm^3 Zellen o,4 mg Menadion in 0,4 cm^3 Lösungsmittel zugefügt. Im Gasraum befindet sich Argon. Die Suspension wird eine Stunde lang geschüttelt. Danach wird der Überstand aus einer G 4 - Fritte abgesaugt. Zu 1,87 ml des Überstandes werden 2,5 mg Kaliumferricyanid in 0,1 ml Wasser pipettiert. Nach 30 min werden 8 ml 1 n Schwefelsäure zugefügt und die Lichtschwächung gegen 0,8 n Schwefelsäure gemessen. (I)

Es waren zwei Vergleichswerte notwendig und zwar eine Zellsuspension gleicher Dichte ohne Menadion (II) und eine Lösung von Menadion in Phosphat, der kein Kaliumferricyanid zugesetzt wurde (III). Die Kontrollen wurden genauso behandelt wie der Versuch.
Die Lichtschwächungen betrugen:

	I	II	III
$\ln i_{o/i}$	1,130	1,260	0,140

$$\ln i_{o/i} = \ln (i_{o/i})_{II} + \ln (i_{o/i})_{III} - \ln (i_{o/i})_{I}$$

Aus $\ln i_{o/i} = 0{,}270$ läßt sich die Menge m des reduzierten Kaliumferricyanid im Volumen v des Versuchsansatzes errechnen.

$$m = \frac{\ln i_{o/i} \cdot v}{\varepsilon \cdot d} \quad \text{(Mikromole)}$$

$v = 9{,}97$ ml $\qquad d = 1$ cm $= 1{,}61 \left[\frac{cm^2}{\text{Mikromole}}\right]$

m = 1,67 Mikromole.

Von 3,4 ml Hefesuspension wurden nur 1,87 ml verwendet. Für die gesamte Menge ist m = 3,04 Mikromole. Ein Mol Chinon reagiert mit 2 Molen Kaliumferricyanid, es wurden also 1,52 Mikromole Chinon reduziert. 0,4 mg Menadion wurden zugefügt, das sind 2,32 Mikromole (Molekulargewicht: 172,2). Davon wurden 1,52 Mikromole, also 66%, als Hydrochinon gefunden.

Protokoll 4

Erhöhung der endogenen Atmung nach Zusatz von Menadion.

Verwendet wurden Gefäß 18 und Gefäß 22.

In beiden Gefäßen: Im Hauptraum 3 ml m/20 $KH_2 PO_4$
mit 38,5 mm^3 Zellen
In der zentralen Wanne 0,2 ml 4 n Kalilauge

Außerdem in Gefäß 18:
In der Birne 0,1 mg Menadion
in 0,2 ml Lösungsmittel

In Gefäß 22:
In der Birne 0,2 ml Lösungsmittel.

Die beiden Gefäße sowie das Thermobarometer wurden 10 Minuten mit Sauerstoff durchgast und weitere 10 Minuten bis zum Beginn der Messung geschüttelt.

Δt	Gefäß 18	Gefäß 22
(min)	Δh (mm)	Δh (mm)
20	- 5,0	- 7,0
20	- 5,0	- 5,0
	Menadion	
10	- 14,0	- 2,5
10	- 15,0	- 3,5
10	- 13,5	- 3,0
10	- 15,0	- 3,5
Q_{O_2}	$\left[\frac{mm^3 \; O_2}{mg \cdot h}\right]$	
Ohne Menadion :	- 2,4	- 2,7
mit Menadion :	- 14,0	- 2,8

Protokoll 5

Endogene Atmung von Hefezellen mit und ohne CO_2 im Medium

(Vergleich von Ein- und Zweigefäß-Methode).

Gefäß 18: Im Hauptraum: 3 ml m 20 KH_2 PO_4 mit 31 µl Zellen.
In der zentralen Wanne:
0,2 ml 4 n Kalilauge
In der Birne: 0,1 mg Menadion in 0,1 ml Lösungsmittel.

Gefäß 9 und 10:
Im Hauptraum: 7 ml m/20 KH_2 PO_4 mit 72,5 µl Zellen.
In einer der Birnen: 0,1 mg Menadion in 0,2 ml Lösungsmittel.

Gefäß 18 wurde 10 Minuten mit reinem Sauerstoff durchgast, Gefäß 9 und 10 für die gleiche Zeit mit 95% O_2 + 5% CO_2. Danach wurde 30 Minuten geschüttelt, dann das Menadion in die Haupträume geholt und nochmals 5 Minuten geschüttelt.

Δt	Gefäß 18	Gefäß 10	Gefäß 9
(min)	Δh (mm)	Δh (mm)	Δh (mm)
10	- 15,4	- 8,5	- 26,5
10	- 15,0	- 9,5	- 25,0
10	- 14,0	- 9,0	- 24,0
10	- 11,5	- 7,5	- 20,0

Q_{O_2} $\left[\frac{mm^3\ O_2}{mg \cdot h}\right]$

Eingefäßmethode: - 16,9

Zweigefäß-methode: - 16,6

Q_{CO_2} $\left[\frac{mm^3\ CO_2}{mg \cdot h}\right]$ 13,8

Respiratorischer Quotient 0,83

Protokoll 6

Wirkung von Antimycin A auf die endogene und die Menadion-Atmung.

Gefäß 18 und 21 wurden benutzt.

In beiden Gefäßen: Im Hauptraum 3 ml m/20 KH_2PO_4 mit 32 mm^3 Zellen und 17,5 γ Antimycin in 0,1 ml Phosphat
In der zentralen Wanne:
0,2 ml 4 n Kalilauge

Gefäß 18: In der Birne: 0,1 mg Menadion in 0,1 ml Lösungsmittel (Methylglykol-Phosphat)

Gefäß 21: In der Birne: 0,1 ml Lösungsmittel.

Die Gefäße wurden 10 Minuten mit Sauerstoff durchgast und danach bis zur ersten Ablesung 15 min geschüttelt.

Δt	Gefäß 18	Gefäß 21
(min)	Δh (mm)	Δh (mm)
10	- 3,0	- 3,0
10	- 2,0	- 2,0
10	- 2,0	- 1,5
	Menadion	
10	- 11,0	- 1,5
10	- 11,5	- 2,0
10	- 12,5	- 1,5
10	- 12,0	- 1,5
Q_{O_2}	$\left[\frac{mm^3\ O_2}{mg \cdot h}\right]$	
ohne Menadion:	- 2,7	- 2,4
mit Menadion	- 13,8	- 1,8

Protokoll 7

Hemmung der Atmung von Hefezellen in Glukose durch Antimycin A.

In Gefäß 18 und 21: In beiden Haupträumen 3 ml m/20 KH_2PO_4 mit 2,2 g% Glukose und 19,5 mm^3 Zellen.
In den zentralen Wannen:
0,2 ml 4 n Kalilauge.
In der Birne von Gefäß 18:
17,5 γ Antimycin in
0,2 ml m/20 KH_2PO_4.
In der Birne von Gefäß 21:
0,2 ml Phosphat-Lösung.

Nach Durchgasen mit Sauerstoff (10 Minuten) wurde 15 Minuten geschüttelt.

Δt	Gefäß 18	Gefäß 21
(min)	Δh (mm)	Δh (mm)
10	- 27	- 28,5
	Antimycin A	
10	- 22,5	- 24,5
10	- 15,0	- 23,5
10	- 7,5	- 26,5
10	- 3,5	- 24,5
10	- 4,5	- 24,0
10	- 2,0	- 25,0
Q_{O_2} $\left[\frac{mm^3\ O_2}{mg \cdot h}\right]$		
Ohne Antimycin:	- 51,9	- 51,4
mit Antimycin während der ersten 30 min:	- 28,2	- 44,8
während der nächsten 30 Minuten	- 6,4	- 44,3

Protokoll 8

Kaliumferricyanid hat in einer Konzentration von 3,5 mg pro ml keinen Einfluß auf die endogene und die Menadion-Atmung.

Gefäß 18 und 21 wurden verwendet.

In den Haupträumen: 3 ml m/20 KH_2PO_4 mit 50,5 mm^3 Zellen.

In den Birnen: 0,1 mg Menadion in 0,1 ml Lösungsmittel.

In den zentralen Wannen: 0,2 ml 4 n Kalilauge.

Außerdem wurden in den Hauptraum des Gefäßes 18 11 mg Kaliumferricyanid in 0,1 ml Phosphat-Lösung einpipettiert, in Gefäß 21 0,1 ml Phosphat. Im Gasraum befindet sich Sauerstoff. Es wurden folgende Werte gefunden:

Δt	Nr. 18	Nr. 21
(min)	Δh (mm)	Δh (mm)
10	- 3,5	- 4,0
10	- 4,0	- 4,0
	Menadion	
5	- 10,5	- 10,5
5	- 9,5	- 9,5
5	- 10,0	- 9,5
Q_{O_2} $\left[\frac{mm^3\ O_2}{mg \cdot h}\right]$		
ohne Menadion:	- 2,8	- 2,8
mit Menadion:	- 14,8	- 13,7

Protokoll 9

Reduktion von Kaliumferricyanid bei Hemmung der Atmung mit Kaliumcyanid.

Es wurden kegelförmige Manometrie-Gefäße mit 2 Birnen verwendet. In 3,0 ml m/20 KH_2PO_4 mit 5 mg Kaliumferricyanid wurden im Hauptraum 60 mm^3 Zellen suspendiert. Eine Birne enthielt in allen Gefäßen 0,1 mg Menadion in 0,1 ml Lösungsmittel, in der anderen waren in 0,1 ml Wasser verschiedene Mengen Kaliumcyanid gelöst. Der Kontrollansatz enthält ebenfalls KCN, aber kein Menadion. Im Gasraum befindet sich Luft. Nach dem Einschwenken von Menadion und Kaliumcyanid werden die Gefäße 30 Minuten geschüttelt, darauf die Zellen abzentrifugiert und 2 ml des Überstandes mit 8 ml 1 n Schwefelsäure verdünnt. Die Lichtschwächung wird bei λ = 300 mμ gegen 0,8 n H_2SO_4 gemessen.
Es wurde gefunden:

Kegel Nr.	Menadion (mg)	KCN (mol)	$\ln {}^{i}o/i$	Reduktion von Kaliumferricyanid $\frac{\text{Mikromole}}{\text{mg . h}}$
I	0,1	10^{-3}	0,470	1,408
II	0,1	$5 . 10^{-4}$	0,500	1,368
III	0,1	$5 . 10^{-5}$	1,168	0,518
IV	0,1	-	1,453	0,155
V	-	10^{-3}	1,575	

Die Lichtschwächung in Kegel V ist der Bezugswert. Aus der Differenz der Extinktionen läßt sich die Menge des reduzierten Kaliumferricyanid auf dieselbe Weise wie in Protokoll 3 errechnen.

Protokoll 10

Hemmung der Hexokinase durch Menadion in vitro.

Die Aktivität kristallisierter Hexokinase nach Einwirkung von Menadion wurde im optischen Test nach WARBURG bestimmt. Die Hexokinase wurde von der Fa. "Sigma" bezogen und zu jedem Versuch in Tris-HCl - Puffer gelöst. Es wurden spaltförmige Mikroküvetten mit einer Schichtdicke d - 1 cm verwendet. Die Lichtschwächung wurde bei einer Wellenlänge λ = 366 mμ gemessen, die Temperatur betrug 25° C.

Für die Versuche wurden folgende Lösungen hergestellt:
Trihydroxymethylaminomethan - HCl - Puffer 0,1 m
mit $2 \cdot 9.10^{-2}$ m Glukose und $2.9.10^{-2}$ m $MgCl_2$

ATP : $3 \cdot 10^{-1}$ m
TPN : $3 \cdot 10^{-2}$ m

Zwischenferment der Fa. "Boehringer" : 2 mg /ml
Tris HCl-Puffer
Hexokinase : 0,2 mg/ml Tris-HCl-Puffer
Menadion : 3 mg/ml Methylglykol

Ein Versuchsansatz setzte sich zusammen aus:
250 μl Tris-HCl-Puffer mit Glukose und $MgCl_2$
20 μl ATP
20 μl TPN
2 μl Zwischenferment
5 μl Hexokinase
5 μl Menadion bzw. Methylglykol

Für jeden Versuch wurden zwei Kuvetten eingesetzt, von denen die eine Menadion, die andere stattdessen nur Methylglykol enthielt. Sie wurden 30 Minuten lang bei 25° C stehengelassen. Danach wurde in beiden die Aktivität der Hexokinase bestimmt, wobei die

Reaktion durch Zugabe des ATP gestartet wurde. Als Änderung der Lichtschwächung wurde z.B. gefunden:

Δt (min)	Ohne Menadion $\Delta \ln \frac{io}{i}$	Mit Menadion $\Delta \ln \frac{io}{i}$
	Δt	Δt
1	91	59
2	96	67
3	93	66
4	94	64
5	93	64
6	91	64
7	96	62

Literaturverzeichnis.

(1) J.P. COLPA-BOONSTRA und E.C. SLATER: The enzymic oxidation of reduced vitamine K_3 (menadione).
Biochem-Biophys. Acta 23, 222 (1957)

(2) H. HOLZER, G. SEDLMAYR und A. KEMNITZ : Zum Wirkungsmechanismus carcinotischer Chemotherapeutica. Hemmung der Glykolyse durch Äthylenimin-Verbindungen.
Biochemische Zeitschrift, 328, 163 (1956)

(3) HOPPE-SEYLER und THIERFELDER : Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, Springer-Verlag, 1953 Band 2, im Kapitel über Gasanalyse, S. 248

(4) ISLER und DOEBEL in H.M. RAUEN : Biochemisches Taschenbuch, Springer-Verlag, 1956.
Kapitel: Ultraviolettspektren, S 491, Abb. 53

(5) L. KIESOW : Über den Stoffwechsel von Kulturhefe beim Wachstum.
Zeitschrift für Naturforschung, 14b, 224 (1959)

(6) L. KIESOW : Über die Wirkung von Vitamin K_3 auf Wachstum und Gärung von Kulturhefe.
Zeitschrift für Naturforschung, 14b, 490 (1959)

(7) L. KIESOW : Über die Aufnahme von 2-Desoxyglucose durch lebende Zellen.
Zeitschrift für Naturforschung, 14b,492 (1959)

(8) L. KIESOW : Über Gärung und Chinon im Zellstoffwechsel.
Zeitschrift für Naturforschung, 15b, 174 (1960)

Fortsetzung des Literaturverzeichnisses.

(9) Zitiert nach F. KUBOWITZ aus O. WARBURG : Schwermetalle, Verlag Dr. Werner Saenger, 1946, Kapitel VII, 4, S. 57, Wieland's Versuche über die Polyphenoloxydase.

(10) C. MARTIUS und R. STRUFE: Biochemische Zeitschrift, 326, 24 - 25 (1954) "Phyllochinonreductase".

(11) VAN R. POTTER und A.E. REIF : Inhibition of an electron transport component by Antimycin A. Journal of Biological Chemistry, 194, 287 (1951)

(12) C.E.M. PUGH : The mode of action of Tyrosinase. Biochemical Journal 24, part II, 1442 (1930)

(13) L.H. STICKLAND : Endogenous respiration and polysaccharide reserves in Baker's Yeast. The Biochemical Journal, 64, 498 (1956)

(14) H. TIEDEMANN, H-J. RISSE und J. BORN : Hemmung der Tumorglykolyse durch 2-Methyl-1,4-Naphthochinon. Zeitschrift für Naturforschung, 13b, 657 (1958)

(15) O. WARBURG : Wirkung des Kohlenoxyds auf die Zellatmung. Biochemische Zeitschrift, 177, 471 (1926)

(16) O. WARBURG : Schwermetalle, Verlag Dr. Werner Saenger, 1946 Kapitel IX, 6, Seite 75. Wirkung des Lichts auf andere Kohlenoxyd-Eisenverbindungen.

Fortsetzung des Literaturverzeichnisses.

(17) O. WARBURG , K. GAWEHN und A-W. GEISSLER : Über die Entstehung des Krebsstoffwechsels in der Gewebekultur. Zeitschrift für Naturforschung, 13b, 61 (1958) sowie Umwandlung des embryonalen Stoffwechsels in Krebsstoffwechsel. Zeitschrift für Naturforschung, 15b, 378 (1960)

(18) W.D. WOSILAIT und A. NASON : Pyridine nucleotide-menadione reductase from Escherichia coli. Journal of Biological Chemistry, 208, 785 (1954)

Danksagung

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. med. et rer. nat. Ernst Schütte danke ich für die Überlassung des Themas und für die Anleitung zu wissenschaftlicher Arbeit.

Berlin, den 4. Juni 1965

Ursula Schmitz
Ärztin

Ursula Schmitz
Ärztin

Lebenslauf.

Am 8.12.1936 wurde ich als Tochter des Rechtsanwalts Bruno Schmitz und seiner Ehefrau Elli, geb. Kaphingst, in Berlin geboren. Wegen der Kriegseinwirkungen wurde ich mit meiner Familie nach Schweikershain/Sachsen evakuiert und erhielt auf der dortigen Volksschule den ersten Unterricht. 1947 kehrte ich nach Berlin zurück und besuchte bis zum Abitur 1955 die Sophie-Scholl-Schule in Schöneberg, und zwar in den oberen Klassen den mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig. Nach dem Abitur studierte ich in Tübingen und an der Freien Universität Berlin, wo ich 1957 das Physikum ablegte. Während der vorklinischen Semester waren es besonders die Fächer Physiologische Chemie und Physiologie, die mich interessierten. Die klinische Studienzeit verbrachte ich in Innsbruck und wiederum in Berlin und bestand hier 1961 das Staatsexamen.

Nach Absolvierung der Medizinalassistentenzeit erhielt ich im August 63 die Approbation als Ärztin.

Während der klinischen Studienzeit führte ich 1959 und 60 im Institut von Herrn Prof. Dr. med. et Dr. rer. nat. E. Schütte die der vorliegenden Dissertation zugrunde liegenden Experimente aus.

Photodruck der Photo Copie GmbH.